# El microscopio electrónico de barrido SEM

## Electrones y resolución

A pesar de que el acrónimo correspondiente sería MEB, nosotros en adelante usaremos el inglés SEM (Scanning Electron Microscope) por resultar el más ampliamente utilizado.

En un sistema óptico la resolución o el poder de resolución PR expresa la capacidad de discriminar dos puntos muy cercanos entre sí. El PR, por lo tanto, es inversamente proporcional al límite de resolución (d), que es la menor distancia que debe existir entre dos puntos para que puedan ser distinguidos separadamente.

Así, la resolución en un sistema óptico perfecto se puede describir matemáticamente a través de la ecuación de Abbe:

$$d = \frac{0.612 \times \lambda}{n \sin \alpha}$$

donde:

**d** = límite de resolución

**λ**= longitud de onda de la radiación que forma la imagen

**n** = índice de refracción medio[2]

**α**= ángulo de abertura en radianes

[2] n sen α a menudo es expresado como NA (apertura numérica) La abertura numérica es función de α (la mitad del ángulo del cono de luz que emerge del objeto, y que es captado por la lente objetivo). La AN, así, se define matemáticamente como la resultante de la multiplicación del seno de α por el índice de refracción del medio a través del cual pasa la luz (n)

Este sería, como hemos dicho, el límite de la resolución de un sistema óptico en el caso de que todas las aberraciones y distorsiones se eliminaran del sistema. Pero, inevitablemente, las aberraciones y distorsiones están siempre presentes, y determinan también el límite práctico de la resolución.

La resolución de un microscopio óptico se encuentra, por tanto, definitivamente limitada por la longitud de onda de la luz, del haz de fotones utilizado para iluminar y observar la muestra. Mientras que el microscopio electrónico, utilizando electrones altamente acelerados, puede operar con un haz cuya longitud de onda resultante sea varios órdenes de magnitud menor. Con respecto a otras partículas, la ventaja que tienen los electrones es que pueden ser fácilmente acelerados mediante una diferencia de potencial. Y, así mismo, para poder emular un sistema óptico análogo al de un microscopio convencional, resulta también posible focalizar el haz de electrones y modificar su trayectoria a través de campos electromagnéticos.

Broglie, mediante la combinación de algunos de los principios de la física clásica con la teoría cuántica, propuso que las partículas en movimiento tienen propiedades ondulatorias y que su longitud de onda se puede calcular, en función de su masa y su nivel de energía. La forma general de la ecuación de Broglie es la siguiente:

$$\lambda = \frac{h}{m \times v}$$

donde:

**λ**= longitud de onda.

**h** = constante de Planck ($6.6 \times 10^{-27}$)

**m** = masa de la partícula ($9.1 \times 10^{-28}$)

**v** = velocidad de la partícula

Cuando un electrón pasa a través de una diferencia de potencial (voltaje de aceleración de campo) V, su energía cinética es igual a la energía del campo, es decir eV (energía en electronvoltios) = V (tensión de aceleración). Como se recordará, $e = mc^2$. Al replantear esto para velocidades por debajo de la velocidad de la luz y partículas con masa real, la energía de un electrón puede enunciarse de la siguiente manera:

$$eV = 1/2\, mv^2$$

donde:

**eV** = energía en electronvoltios (e = 4.8 X 10-10)

**m** = masa de la partícula

**v** = velocidad de la partícula

Mediante el uso de algunas suposiciones acerca de la velocidad de la partícula y su masa, es posible expresar ya sea la longitud de onda (λ o la velocidad (v) en términos del voltaje de aceleración (V). Mediante la sustitución de los valores de h y m de más arriba, la ecuación para λ se reduce a lo siguiente[3]:

$$\lambda = \frac{1.23 \text{ nm}}{V^{1/2}}$$

[3] Hay que advertir que a medida que la velocidad del electrón se acerca a la velocidad de la luz, se hace necesario usar las ecuaciones de Einstein de la relatividad para una mayor precisión, dado que la masa y cantidad de movimiento de electrones aumenta con la velocidad

Este valor de λ puede ser sustituido en la ecuación de Abbe. Dado que el ángulo α es generalmente muy pequeño, el valor se aproxima al de sen α , por lo que se sustituye. Dado que n (índice de refracción) es esencialmente λ, eliminamos, y multiplicamos 0.612 por 12,3 para obtener 0.753. Por lo tanto, la ecuación se reduce a la siguiente

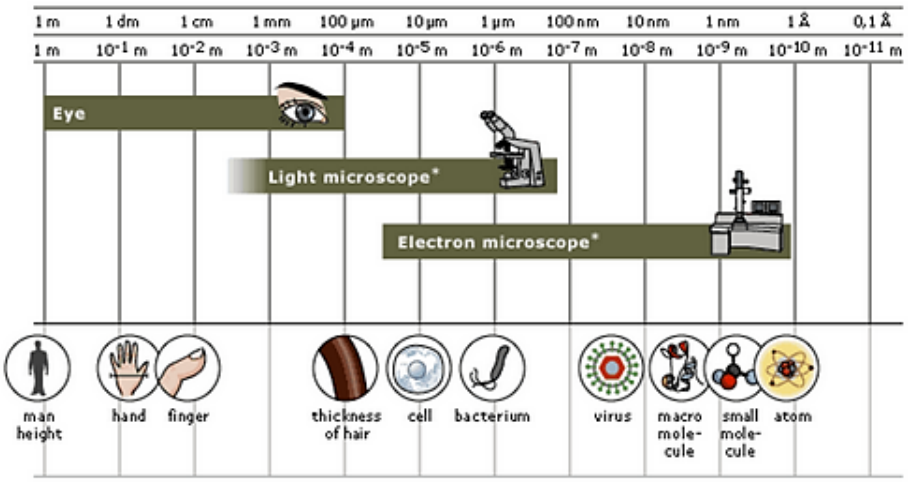
$$d = \frac{0.753}{\alpha \, V^{1/2}}$$

donde:

**d** = resolución en nm

**α**= ángulo de apertura en radianes

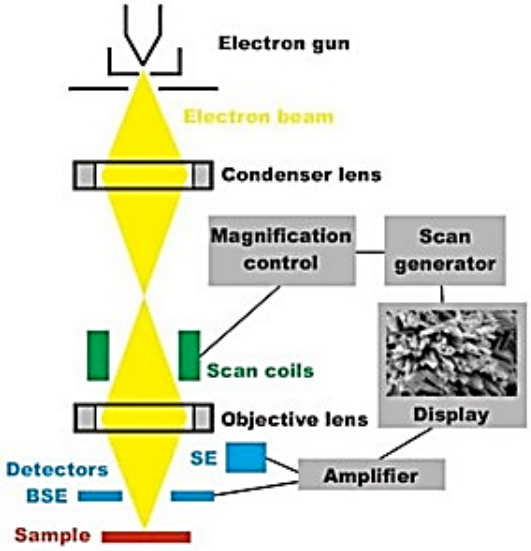
**V** = voltaje de aceleración




En última instancia y en términos prácticos, la resolución espacial del SEM dependerá, como veremos más adelante, del tamaño del haz de electrones utilizado que a su vez dependerá tanto de la longitud de onda de los electrones como del sistema utilizado para producir el haz. Y, así mismo, la resolución también estará condicionada por el tamaño del volumen de interacción, el volumen de material de la muestra que interactúa con el haz de electrones.

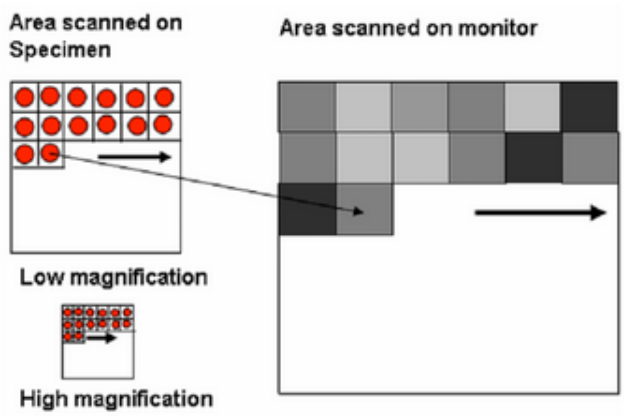
EL microscopio electrónico de barrido o SEM, como más comúnmente se le conoce por su acrónimo en inglés (Scanning Electron Microscope), es un instrumento compuesto por un sistema óptico-electrónico que explora la muestra por medio de un haz móvil de electrones que, como resultado de la interacción electrón-materia, provoca la generación de diversas radiaciones.

Dada la facilidad de dispersión de los electrones, para mantener el control del haz resulta necesario mantener la columna en altos niveles de vacío. Así, en el SEM, el haz de electrones, procedente del cañón -5- atraviesa la columna, a través del sistema óptico de lentes electromagnéticas, llegando a la muestra, donde un generador de barrido produce el movimiento del haz, de manera que barre o "escanea" la muestra punto a punto.




*(Fig. 2) Esquema básico del funcionamiento de un SEM*

El sistema óptico, compuesto esencialmente por una lente condensadora y una lente objetivo, focaliza el haz saliente del cañón de electrones, modificando su diámetro y focalizándolo sobre el espécimen. Y unas bobinas deflectoras, controladas por el generador de barrido, son las responsables de que el haz focalizado rastree la muestra.




*(Fig. 3) Correspondencia del barrido del haz punto a punto y la imagen del monitor*

El haz rastrea de izquierda a derecha y de arriba abajo, existiendo una correspondencia uno a uno entre el patrón de barrido de la muestra y el patrón de barrido utilizado para producir la imagen en el monitor. De ese modo, la resolución de imagen seleccionada afectará, obviamente, al número de píxeles por fila así como el número de filas que constituyen el área escaneada.

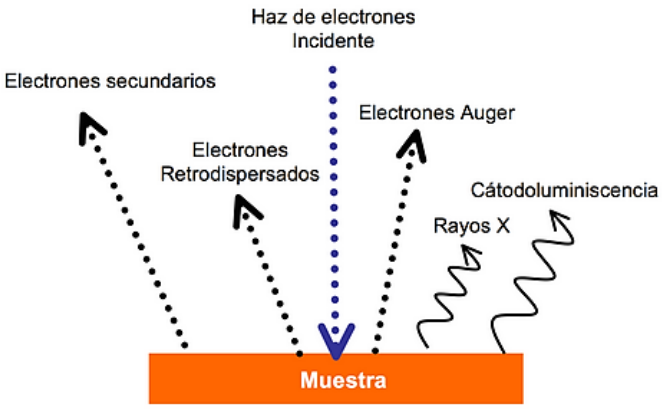
De la interacción del haz con la muestra en cada punto se genera una señal que es recogida y procesada para generar la imagen. El procesador toma la intensidad de la señal procedente de un píxel en la muestra y la convierte en un valor de escala de grises del correspondiente pixel en el monitor. La imagen final del monitor será, así, un patrón de barrido bidimensional de valores de escala de grises.

Para cambiar la magnificación, todo lo que necesitaremos hacer es cambiar el tamaño del área de barrido sobre la muestra. El tamaño del patrón de rastreo del monitor es constante, de manera que la magnificación aumentará si reducimos el tamaño del área escaneada en la muestra.

La colisión del haz de electrones altamente acelerado con los átomos de la muestra da como resultado la producción de varios tipos de radiación (Ver fig. 4) que puede ser detectada y analizada por detectores específicos. Estas señales revelan una valiosa información acerca de la muestra como la morfología y topografía de la superficie, la composición elemental, la conductividad eléctrica, la estructura cristalográfica, etc.

Estos son los principales fenómenos se producen al interactuar el haz de electrones con el espécimen:

1. Emisión de electrones secundarios
2. Emisión de electrones retro dispersados
3. Electrones absorbidos
4. Emisión de rayos X
5. Emisión de fotones
6. Electrones Auger




*(Fig. 4) Esquema básico de las diferentes señales generadas a raíz de la interacción del haz primario con la superficie de la muestra. En este caso no se muestran las que corresponderían a la interacción del haz de electrones con una muestra delgada como sería el caso del TEM.*

Todos estos fenómenos se encuentran de un modo u otro relacionados entre sí y dependen, hasta cierto punto, de la topografía, el número atómico y el estado químico de la muestra.

De la interacción del haz principal de electrones con la muestra nos centraremos en dos tipos de dispersión de electrones: dispersión o "scattering" de electrones elástica e inelástica. Los eventos inelásticos ocurren cuando el haz interacciona con el campo coulómbico del núcleo del átomo de la muestra.

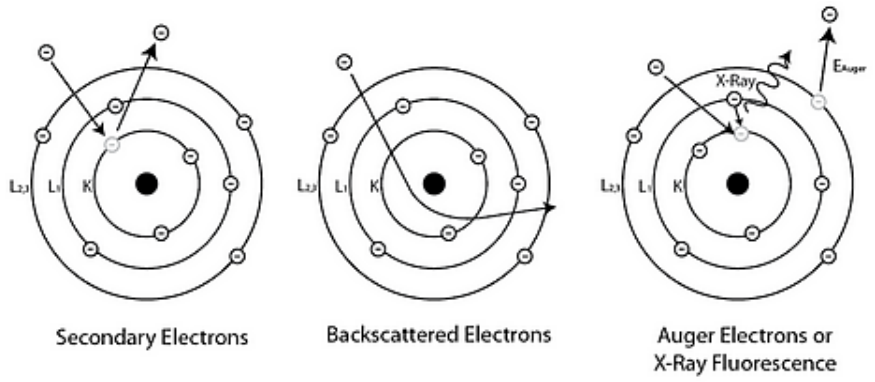
La fuerza coulómbica se define como:

$$F = Q1Q2 / 4\pi\varepsilon 0r2$$

Siendo r la distancia entre las cargas Q1 y Q2 y ε0 la constante dieléctrica. Cuanto más cerca pasa el electrón del núcleo, es decir, a menor r, mayor es F y por consiguiente el ángulo de dispersión.

En este tipo de dispersión el electrón incidente pierde parte de su energía, pero sin sufrir una desviación significativa de su trayectoria. El resultado es una transferencia de energía al átomo de la muestra y una potencial expulsión de un electrón de este átomo llamado electrón secundario (Secondary Electron SE). Estos electrones, por definición, tienen una energía menor a 50 eV. Y, si la vacante ocasionada se llena desde un orbital superior, entonces se produce un rayo X característico de esa transición de energía.

De otro lado, la dispersión elástica da como resultado un cambio en la dirección del haz de electrones, pero sin una alteración significativa de la energía del haz de electrones (<1 eV). De modo que, si el haz de electrones desviado elásticamente se dispersa de nuevo fuera de la muestra, los electrones se denominan retrodispersados (backscattered electron BSE). Un BSE puede tener un rango de energía de 50 eV a casi la energía del propio haz incidente. Pero, sin embargo, la mayoría de los electrones retrodispersados retienen al menos 50% de la energía del haz incidente.




*(Fig. 5) Diversos modos de emisión de electrones a partir de la incidencia de un haz de electrones: Los electrones secundarios son dispersados inelásticamente y los retro dispersados elásticamente. Los electrones Auger y los rayos X son causados por la eyección de electrones de capas internas compensada por electrones de capas orbitales superiores, ocupando así el nivel de energía vacante, o bien se da un exceso de energía en forma de un rayo X característico o la expulsión de un electrón a un orbital exterior.*

De hecho, los electrones secundarios (SE) pueden ser generados por 3 mecanismos diferentes:

**1.** Por interacciones de electrones procedentes del haz incidente con átomos de la muestra.

**2.** Por interacciones de alta energía de electrones retrodispersados (BSE) con átomos de la muestra.

**3.** O bien, pueden ser producidos por electrones retrodispersados (BSE) de alta energía que impactan contra las piezas polares del microscopio o/y otros objetos sólidos cerca del espécimen.

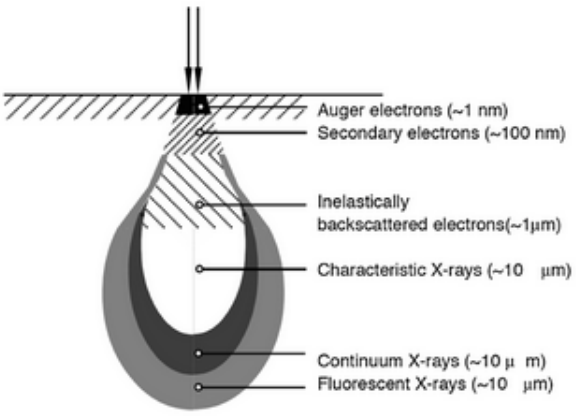
El SEM utilizará para la formación de imágenes los electrones secundarios, dado que se producen cerca de la superficie del espécimen y muestran su estructura topográfica. La intensidad de esta radiación superficial (electrones de baja energía) varía conforme la sonda barre la superficie del espécimen, y así se va presentando en la imagen formada en el monitor representando su topografía.

De otro lado, la variación de emisión de electrones retrodispersados (electrones de alta energía) dependerá de la composición de la muestra, pudiendo distinguir así la variación de señal causada por la diferencia en el número atómico promedio, la orientación cristalográfica, etc. Y nos proporcionan, de ese modo, información adicional sobre la distribución de la composición de la superficie de la muestra.

Como ya se ha mencionado, en el SEM el haz de electrones no está estático, sino que, con la ayuda de bobinas deflectoras, barre punto a punto pequeñas áreas rectangulares de la superficie de la muestra. De este modo también la señal de rayos X puede capturarse y procesarse de diferentes formas:

- Fijado el haz de electrones en un solo punto de la muestra, se puede realizar un microanálisis elemental cualitativo y cuantitativo de los elementos constituyentes del espécimen en ese volumen concreto de interacción.
- Analizar cualitativa o cuantitativamente una línea y reproducir dicho análisis gráficamente.
- Sintonizar el espectrómetro para uno o diversos elementos predeterminados y correlacionar la información con la de la imagen de la superficie de la muestra escaneada, obteniendo así un mapa de localización elemental.

Resulta también importante entender desde donde llegan las diferentes señales que pueden ser detectadas (Figura 6). Los electrones Auger y los secundarios con bastante baja energía se absorben fácilmente en cualquier material y, por lo tanto, solamente los generados cerca de la superficie pueden dejar la muestra para llegar al detector. Los electrones retrodispersados tienen la misma energía que el haz incidente y, por lo tanto, penetran en la muestra más fácilmente. Los rayos X podrán proceder de zonas más profundas.



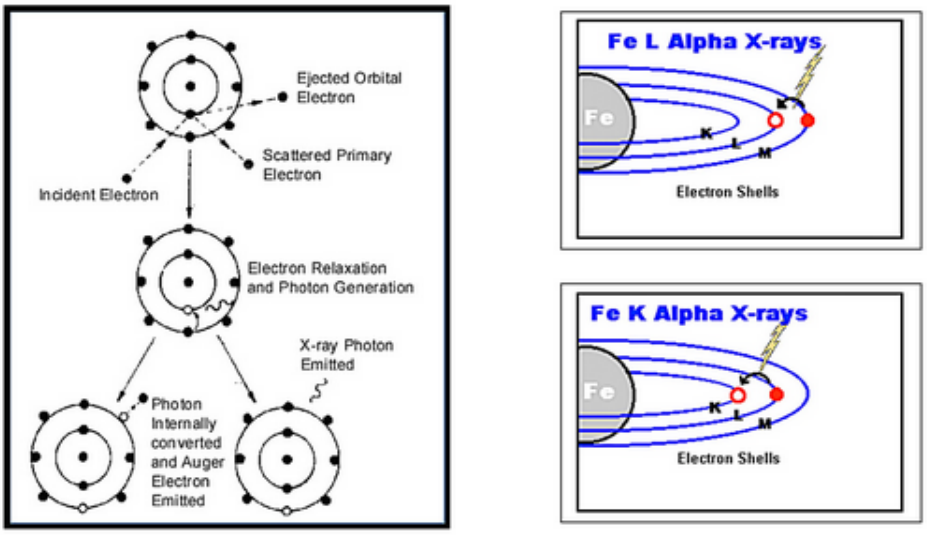

*(Fig. 6) Esquema del volumen de interacción sobre una muestra compacta y el origen de las diferentes señales detectables.*

Cuando el haz de electrones golpea la materia, comienza a ensancharse a causa de fuertes efectos de dispersión elástica. Simultáneamente, las interacciones inelásticas causan una pérdida de energía de los electrones. Si la muestra es muy gruesa, la energía será transferida completamente a la muestra. El resultado global es un volumen de interacción en forma de pera como vemos en la figura más arriba. La profundidad de penetración t dependerá de la energía del haz de electrones incidente (t ~ V) y de la composición sobre del material sobre el que interactúa (t ~ 1 masa / atómica).

Las dimensiones del volumen de interacción varían proporcionalmente al voltaje de aceleración: A medida que la energía del haz aumenta la tasa de pérdida de energía en la muestra disminuye y, por tanto, los electrones del haz penetran más profundamente en la muestra. También la probabilidad de dispersión elástica es inversamente proporcional a la energía del haz. Con menos dispersión elástica, la trayectoria del haz cerca de la superficie de la muestra será más recta y los electrones penetraran más profundamente en la muestra. Así, el efecto acumulativo de la dispersión elástica causa que algunos electrones se propaguen de nuevo hacia la superficie ampliando así e volumen de interacción.

El efecto contrario ocurre cuando el número atómico promedio de la muestra aumenta: La tasa de pérdida de energía del haz de electrones se incrementa a mayor número atómico y, por lo tanto, los electrones no penetran tan profundamente en la muestra.

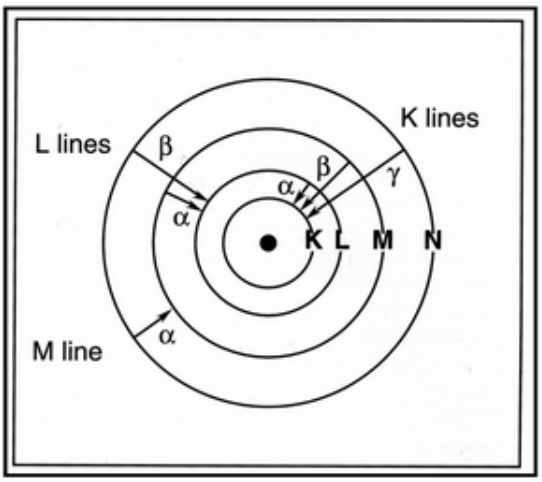
Los rayos X pueden tener una energía casi igual a la del electrón haz primario y por lo tanto pueden proceder de zonas bastante profundas de la muestra (ver fig. 4). La generación de fotones de rayos X se obtiene al ser expulsado un electrón de alguno de los orbitales internos del átomo y que esta vacante sea ocupada por alguno de los electrones de un orbital más externo. Así, de la colisión inelástica entre el haz primario y un electrón de un orbital interior da como resultado la emisión de ese electrón del átomo. Y la energía liberada por este evento de reemplazo de electrones produce un fotón con una energía igual a la diferencia de en la energía entre los dos orbitales.




*(Fig. 7) Esquema de posibles saltos orbitales de los electrones y la correspondiente emisión de fotones.*

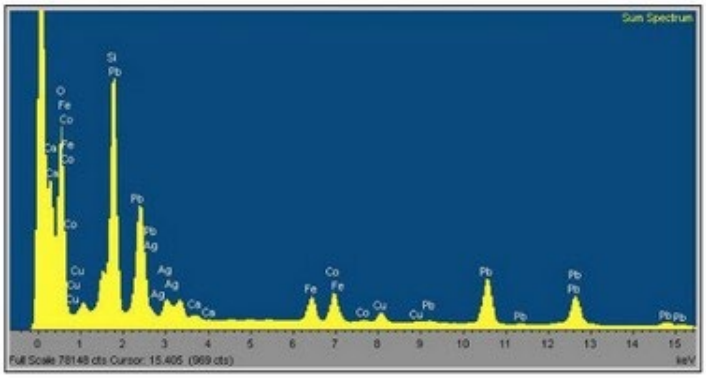
Como ya mencionamos más arriba, la energía de estos fotones de rayos X resulta característica de la transición electrónica ocurrida siendo así característica de cada átomo. Así, obtendremos señales específicas correspondientes tanto a la procedencia orbital del electrón expulsado (K, L o M) como a la que ocupa la vacante. Así, por ejemplo, a la energía del rayo X procedente de un electrón eyectado de la capa K será del tipo K, pero si la vacante la ocupa un electrón del orbital L entonces le llamaremos Kα. Además, se llega a considerar no solamente el orbital procedente y el que cubre la vacante, sino que, también se tienen en cuenta los suborbitales.

Para la identificación positiva de un elemento será necesaria la comprobación de toda la familia de picos para un elemento dado dentro del espectro analizado. Aunque, algunos eventos (Mα, por ejemplo) solamente son posibles en átomos con un alto peso atómico.

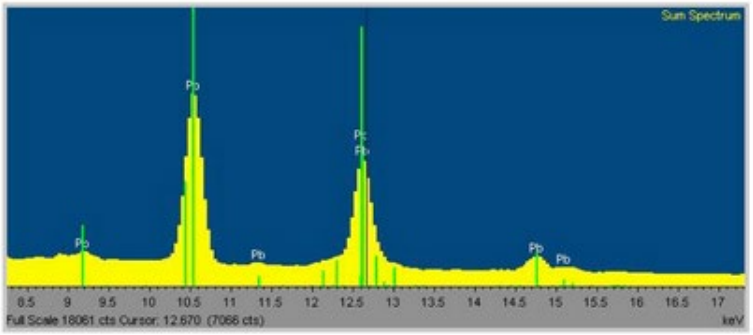


*(Fig. 8)*

*En un espectro de Rayos X aparecen picos a diferentes energías. Cada elemento se caracteriza por un conjunto de picos a energías características, por lo que se puede determinar la composición de la muestra. La altura de los picos depende de la cantidad presente en la muestra y de la probabilidad de que se produzca el pico característico para cada elemento.*

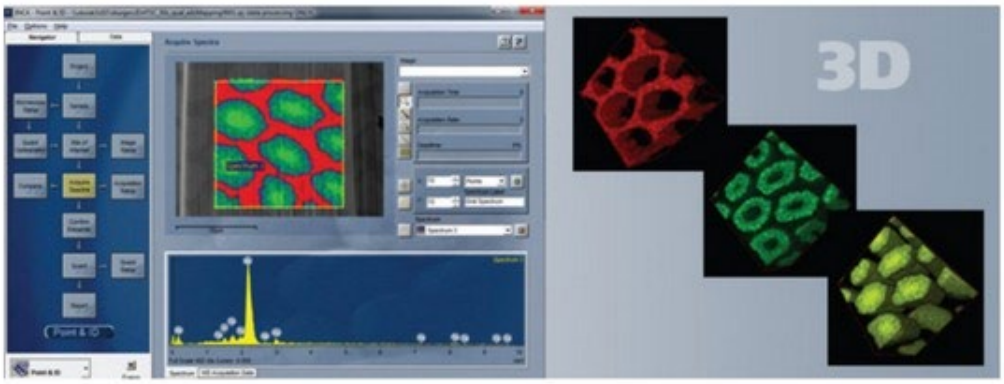



*(Fig. 9) Detalle del espectro anterior: En verde marcadas las posiciones de los picos correspondientes a la señal de las líneas L y M del Pb*




*(Fig. 10) Mapa donde se muestra la composición asignando un color a cada elemento identificado en la estructura.*

Además de la posibilidad de adquirir espectros de puntos determinados de la muestra, existe también la posibilidad de realizar mapas elementales que correlacionan la imagen adquirida de secundarios o retrodispersados con la presencia o no de los elementos que seleccionemos el área escaneada. De este modo se obtendrán mapas individuales de distribución elemental que pueden ser superpuestos a la imagen de SE o BSE.

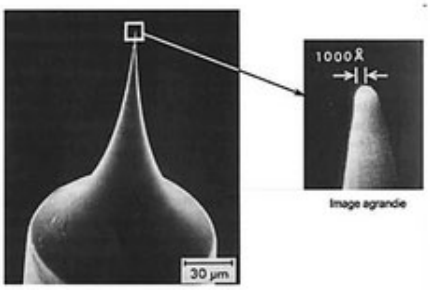



*(Fig. 11) Mapa donde se muestra la composición asignando un color a cada elemento identificado en la estructura.*

El cañón proporciona un haz estable de electrones altamente acelerados que mediante el sistema óptico focalizado sobre la muestra. El control de este haz sería imposible a presión atmosférica, debido a que las moléculas de gas en el aire dispersarían los electrones. Por lo tanto, tanto el cañón como el resto de la columna del SEM ha de mantenerse en vacío, y la muestra debe ser capaz de resistir el cambio de presión de manera que se altere su morfología lo menos posible.

Para la generación del haz de electrones se pueden utilizar dos sistemas: el termoiónico o el de emisión de campo (FEG Field Emisión Gun): Los de tipo termoiónico, que producen el haz por calentamiento de un filamento, en este caso se utilizan o bien filamentos de Tungsteno (W) o bien cristales de Hexa boruro de Lantano (LaB6). En los cañones FEG se utiliza un campo eléctrico para facilitar la emisión de electrones. Se requiere unas condiciones de vacío mucho mejores que en los termoiónicos (alrededor de 10-10 Torr). Pero la complicación técnica es compensada por unos valores de luminosidad de varios órdenes de magnitud mayor.

El diámetro de la sonda o haz puede variarse alterando la corriente de la lente condensadora, permitiendo una mayor resolución, una cierta disminución de la aberración de las lentes y una menor corriente de sonda.



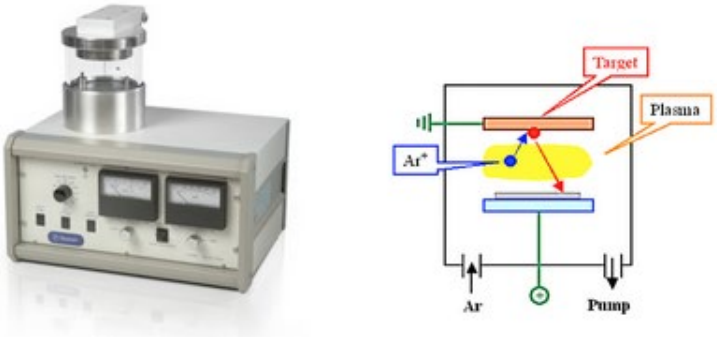
*(Fig. 12) Filamento de un cañón de emisión de campo. (Izquierda)*

*(Fig. 13) Filamentos para cañones de tipo termoiónico de W y de LaB6. (Derecha)*

**Preparación de las muestras**

Debido, como hemos dicho antes, a que el SEM utiliza electrones y trabaja en condiciones de alto vacío para poder formar una imagen, se puede requerir una mínima preparación especial. Por ejemplo, las muestras hidratadas han de seguir algún tipo de proceso previo de deshidratación. Las muestras biológicas deben fijarse químicamente de manera previa. Y aunque los metales conductores no requieren preparación antes de ser observados, toda muestra no conductora necesita recubrirse con una capa delgada de material conductor. Esto último se hace mediante el uso de dispositivos que evaporan carbono en condiciones de vacío o bien depositan algún metal pesado, (Au habitualmente) mediante un aparato llamado "sputter-coater" (podría traducirse como pulverizador catódico)

El dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica o sputtering utiliza un campo eléctrico y gas argón para su funcionamiento: La muestra se coloca en una pequeña cámara al vacío. El argón y un campo eléctrico causan una atmósfera ionizada, propiciando que los iones de argón positivos impacten sobre una lámina de oro polarizada con carga negativa.




*(Fig 14) Imagen de un Sputter coater comercial y esquema de funcionamiento básico*

Los iones de argón arrancan los átomos de oro de la superficie de la lámina, que se Re depositan homogéneamente sobre la superficie de la muestra. Se produce así un recubrimiento de oro muy fino y de grosor bastante controlable.

Si lo que se pretende es adquirir imágenes de calidad, se utiliza el recubrimiento con Au. Si lo que se requiere es analizar la preparación mediante rayos X, entonces resulta mejor opción el carbono ya que la señal de este elemento no interferirá tan drásticamente con el resto de los elementos, a no ser que precisamente sea carbono lo que se pretenda analizar. Existen algunos SEM que pueden trabajar en condiciones de bajo vacío, con una presión superior en la cámara del espécimen a la habitual en los SEMs convencionales. Las presiones de trabajo en estos microscopios suelen ser mayores de 10 Pa, mientras que la presión de un SEM convencional suele estar alrededor de 10-4 Pa. Estos microscopios suelen dedicarse a la observación de muestras biológicas, materiales que presenten una especial sensibilidad al vacío o muestras únicas que no sea posible recubrir (muestras arqueológicas, por ejemplo).

En bajo vacío, se disminuye el efecto de carga en la muestra descrito más arriba y, de este modo, se pueden observar también muestras no conductoras, sin necesidad de recubrirlas.

**Ventajas generales del SEM**

• Proporciona una gran profundidad de campo.

• Gran versatilidad amplia gama de aplicaciones.

• Aporta información versátil mediante los diversos detectores.

• Operación rápida y fácil manejo.

• Posibilidad de observar objetos más grandes que en un TEM, incluso en condiciones de bajo vacío en algunos casos para evitar alteraciones de la muestra.

• No resulta preceptivo cortar o adelgazar la muestra para la observación y, en una gran mayoría de casos, no requiere prácticamente preparación.

**Desventajas generales del SEM**

• Aunque existen versiones de sobremesa con un precio algo más asequible, un microscopio SEM conlleva un alto coste económico.

• Solamente se pueden examinar estructuras superficiales y con menor resolución que un microscopio de transmisión, a pesar de que los actuales microscopios dotados con cañones FEG han mejorado este último aspecto notablemente.

• Supone una mínima formación específica, tanto para su uso como para la preparación de muestras.

• La preparación de muestras puede provocar artefactos sobre todo en muestras biológicas...

• Las condiciones de vacío y espacio limitado de la cámara del espécimen condicionan el tamaño máximo de la muestra y la preparación, sobre todo en el caso de los materiales orgánicos.

https://www.coursera.org/learn/tecnicas-microscopicas-caracterizacion

*Módulo 1: Microscopía*


*Bargalló i Iñíguez, Robert, El microscopi electrònic de "Scannig", Intitut d'Estudis Catalans, Treballs de la Societat Catalana de Biologia, 1971: 30*

*Goldstein, Joseph et al, (editors) Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientist and Geologists, 2cond edition, 2012*

*Krumeich, Frank, The Electron Microscopy Site, ETH Zürich, 2016 http://www.microscopy.ethz.ch (Accesible en 25/04/2016)*

*Seoane, J.R., Llobet, X. (editors) Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research, Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona, 2011*

*Russell, Scott D., Principles and Techniques of Transmission Electron Microscopy, BIOL/MBIO/PBIO 5364 – Fall 2015, http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/ (Accessible en 25/04/2016)*

*Sorrivas de Lozano, V., Morales, A., Yañez, M.J., Principios y práctica de la Microscopía Electrónica, 1ra. Ed. E-book, 2014*